

**STOFFWECHSELENZYME IN SPERMIEN
UND SEMINALPLASMA**

ULRICH VOGEL

1985

*Diss.
München*

Aus dem Institut für
Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände:

Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Prof. Dr. F. Miller

Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Prof. Dr. H. G. Zachau

STOFFWECHSELENZYME IN SPERMEN

UND SEMINALPLASMA

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrich Vogel

aus

Inning am Ammersee

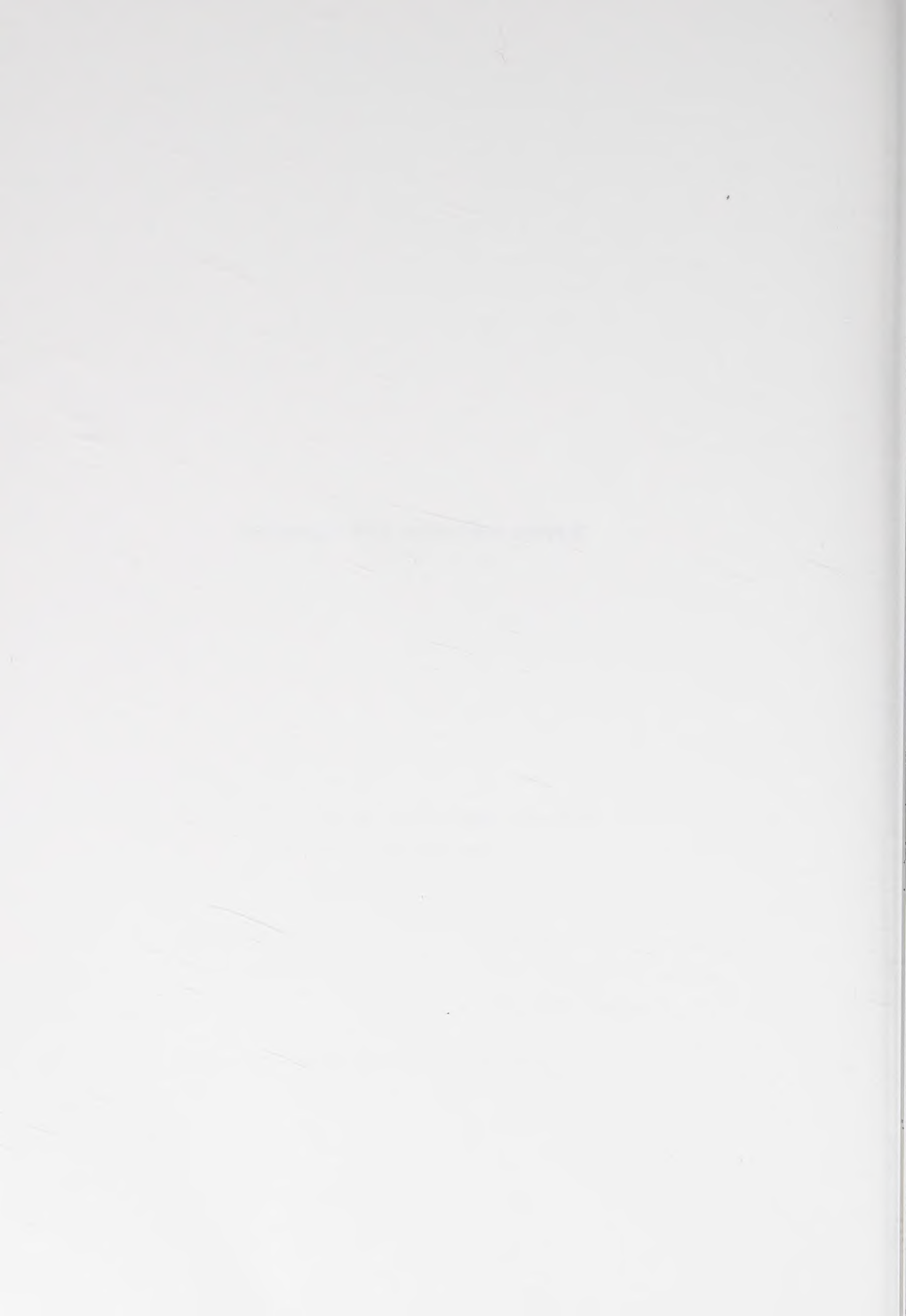
München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. G. K. Krietsch
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Th. Bücher
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.1985

Brigitte und meinen Eltern gewidmet

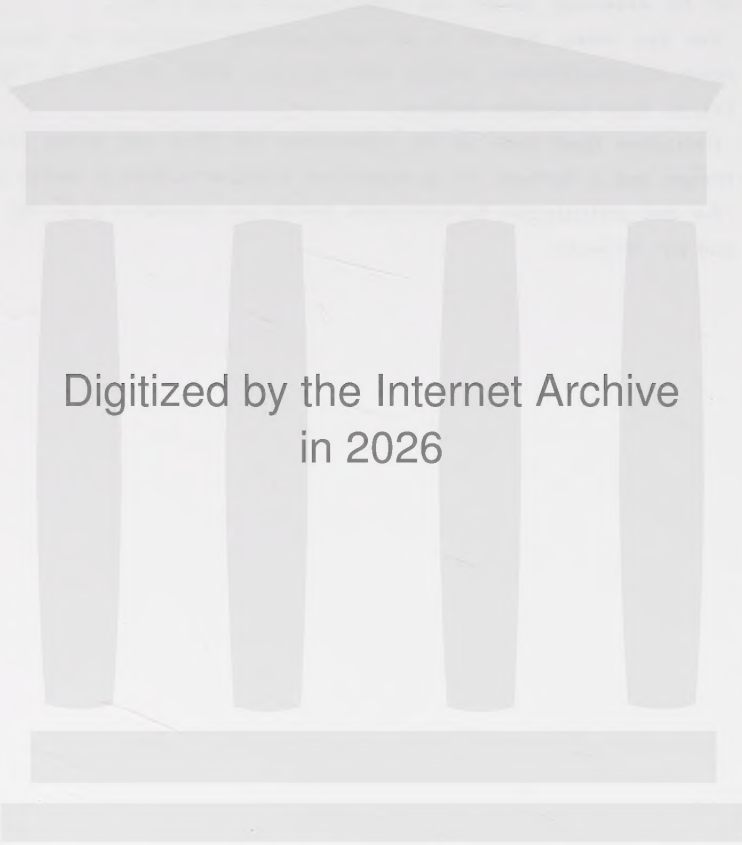


Meinen Doktorvätern Prof.Dr. Th. Bücher und Prof.Dr. W.K.G. Krietsch danke ich für Anleitung, Geduld und Gelingenlassen dieser Arbeit.

Von den vielen, die mir in der andrologischen Abteilung der dermatologischen Universitätsklinik halfen, seien Prof.Dr. Schill, Fr. Dr. E. Töpfer und FrI. A. Weiß besonders erwähnt.

Herzlichen Dank auch an die Laborcrews für Hilfe und Kritik und an H. Hunger und J. Springer für gelegentliche Erfolgserlebnisse in harten Stunden.

Bei den statistischen Berechnungen halfen mir besonders Franz M. Zwiebel und Dr. Wiseman.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554807_0056

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	2
2. Methodik	5
2. 1. Probenbereitstellung	5
2. 2. Enzymatische Aktivitätsbestimmungen	5
2. 2. 1. Lactatdehydrogenase (L D H)	6
2. 2. 2. Phosphoglyceratkinase (P G K)	6
2. 2. 3. Hexokinase (H K)	8
2. 2. 4. Creatinkinase (C K)	8
2. 2. 5. Glucose-6-Phosphat Isomerase (G P I)	9
2. 3. Puffer	9
2. 4. Elektrophorese	10
3. Experimente	12
3. 1. Probenbereitung	12
3. 2. Probenlagerung und Haltbarkeit	13
3. 3. Elektropherogramme	13
3. 3. 1. Lactatdehydrogenase (L D H)	14
3. 3. 2. Phosphoglyceratkinase (P G K)	15
3. 3. 3. Hexokinase (H K)	16
3. 3. 4. Creatinkinase (C K)	17
3. 3. 5. Glucose-6-Phosphat Isomerase (G P I)	18
3. 4. Variantensuche	19
3. 5. Antikörperversuch	20
3. 6. Waschversuche	23
4. Korrelation und Statistik	29
5. Diskussion	35
6. Literatur	43
7. Zusammenfassung	48

1. EINLEITUNG

Im Seminalplasma und in Spermienhomogenaten von Säugetieren lassen sich Enzyme für alle bekannten Stoffwechselwege zur Energiegewinnung nachweisen, außer für den Abbau von Pentosen (29). Die Energie in Form energiereicher Phosphate wird hauptsächlich über die Glycolyse und oxidative Phosphorylierung gewonnen und dient den Spermatozoen primär zur Fortbewegung. Um die Geißel des Säugerspermiums in helikale Rotation zu versetzen, müssen Tubulin und Dynein unter ATP-Verbrauch miteinander agieren. Ein Maß der metabolischen Aktivität ist der Fructolyseindex, der Umsatz der Fructose von einer Milliarde Spermatozoen pro Stunde bei 37°C. Beim Menschen können aber auch Oligospermien mit hohem Fructose- oder Pyruvatverbrauch vorkommen (entkoppelter Metabolismus). Die menschliche Ejakulationsflüssigkeit enthält eine hohe Konzentration an Fructose (2,2-30 mM) und Glucose (0-6 mM), die mit 50%-80% der Ejakulationsmenge aus den Samenbläschen stammen (29,46).

Die befruchtungsfähigen Spermien suchen sich ihren Weg chemotaktisch zum alkalischeren pH-Milieu (das saure Scheidenmilieu, pH 4, ist tödlich) und rheotaktisch durch etwa zwei dutzend vorgegebener Kanäle im Schleimpfropf des Muttermundes. Sie bewegen sich durch den Uterus, die Tubenostien und gegen den Flimmerstrom des Tubenepithels der Oocyte zu. Statistisch gesehen ist die Chance, daß das Ei durch ein Y-Spermium befruchtet wird, höher als durch ein X-Spermium, das 2,8% schwerer und deshalb möglicherweise langsamer ist (29). Zum Erreichen derselben Geschwindigkeit müßten die schwereren X-Spermien wohl mehr Mitochondrien und eine höhere Aktivität der Glycolyseenzyme als Y-Spermien aufweisen.

Von den Enzymen der Glycolyse sind spermienspezifische Isoenzyme der Hexokinase (HK), Lactatdehydrogenase (LDH) und Phosphoglyceratkinase (PGK) bekannt.

Das Augenmerk der Erforschung der spermienspezifischen Isoenzyme richtete sich bisher vor allem auf die LDH-C₄ (8,9,16,17,29,34,37,39,44) und weniger auf die PGK-2 (11,12,13, 15,29,40,42,43,45). Im Labor von Dr. Krietsch wurden schwerpunktmäßig die PGK-1 und PGK-2 der Maus, und beim Menschen bisher nur die PGK-1 in Zusammenhang mit der PGK - München untersucht (24,25,26,27). Von der PGK sind beim Menschen zwei Genorte bekannt. Die PGK-1 ist auf dem X-Chromosom codiert (38) und wird in allen somatischen Geweben exprimiert (11,41). Die PGK-2 dagegen wird ausschließlich in den Spermien und deren Vorstufen exprimiert, die chromosomale Lokalisation konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die gleichen Verhältnisse findet man bei der Maus und anderen Säugern. Bei der Maus liegt der Genort der PGK-2 auf Chromosom 17 in unmittelbarer Nachbarschaft des H 2 -Komplexes (15). Der H 2-Komplex ist homolog zum HLA-Komplex beim Menschen auf Chromosom 6 und nach bisherigen Erkenntnissen kann man eine Synthenie von HLA und der PGK-2 auch beim Menschen erwarten. Mit Hilfe einer PGK-2 Variante ließe sich diese Kopplung nachweisen. In Inzuchtstämmen der Maus sind bisher drei Allele der PGK-2 entdeckt worden (42,43). Allele der PGK-2 wurden beim Menschen bisher noch nicht gesucht. Die PGK-2 ist aber auch auf Grund ihrer gewebsspezifischen Expression und der Tatsache, daß sie als autosomales Enzym im Gegensatz zur PGK-1 nicht der Lyonisierung unterliegt, für das Studium der Zelldifferenzierungsprozesse von großem Interesse.

Im Gegensatz zur PGK wird bei der LDH eine umgekehrte chromosomale Lokalisation vermutet. Die beiden somatischen Polypeptidketten der LDH sind autosomal kodiert. Der Genort der LDH-A liegt auf Chromosom 11 und der LDH-B auf Chromosom 12 (5). Für die spermienspezifische Polypeptidkette C ist die Kopplungsgruppe, wie bei der PGK-2, noch nicht gefunden. Auch hier könnte die Kopplungsgruppe mit Hilfe einer Variante ermittelt werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit war, eine allele Variante der spermienpezifischen Phosphoglyceratkinase (PGK-2) und der spermienpezifischen Lactatdehydrogenase (LDH-C₄) zu finden, oder einen Polymorphismus auszuschließen.

Für diesen Zweck mußten viele Spermaproben untersucht werden, und es sollte aus einem randomisierten Teil der Proben eine Korrelation zwischen morphologischen Parametern und den Aktivitäten der gesamten und der spermienpezifischen Isoenzyme von LDH und PGK im Seminalplasma ermittelt werden. Bei Bestehen einer Korrelation wäre die Untersuchung der Aktivitäten spermienpezifischer Isoenzyme zusätzlich zur mikroskopischen Beurteilung der Morphologie in der andrologischen Ambulanz sinnvoll. Die mikroskopische Beurteilung kann durch die Enzymanalytik sicher nicht ersetzt, doch ergänzt und korrigiert werden. Das Seminalplasma wurde als Untersuchungsmedium gewählt, da es einfach und reproduzierbar zu gewinnen ist, was für die andrologische Routine wichtig wäre. Korrelationen wurden bisher für die gesamte LDH, die LDH-C₄ (9,34) und die CPK (35) hergestellt, nicht jedoch für PGK-1 und das spermienpezifische Isoenzym PGK-2.

2. METHODIK

2. 1. Probenbereitstellung

Die Proben für diese Arbeit wurden dankenswerterweise von dem andrologischen Institut (Leitung Prof.Dr.H.Schill) der dermatologischen Universitätsklinik München (Leitung Prof.Dr. O.Braun-Falco) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um ein Patientenkollektiv, das sich hauptsächlich aus Männern mit unerfülltem Kinderwunsch, aber auch aus Männern, die zur andrologischen Statuserhebung vor und nach urologischen Operationen und zur Abklärung der Eignung als Samenspender für eine Samenbank untersucht wurden, zusammensetzt. Zudem konnte noch eine Anzahl von jungen, gesunden Männern als Spender gewonnen werden. Die Karenzzeit betrug in allen Fällen fünf Tage, Ort der Gewinnung war die andrologische Ambulanz.

Die Proben wurden dort im 35°C warmen Wasserbad bis zur Verflüssigung (nach etwa 1/2 bis 3/4 Stunde) aufbewahrt, dann nach Menge, Geruch, Farbe und pH beurteilt und auf morphologische Parameter wie Anzahl, Beweglichkeit, Gehalt an sonstigen Zellen und Verhalten beim Eosinfärbetest untersucht. Nach der Verflüssigung wurde ein Teil des Ejakulates für die biochemische Untersuchung verwendet.

2. 2. Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Zur quantitativen Enzymaktivitätsbestimmung im Küvettenansatz mit Photometer und zur Anfärbung der Elektrophoresegele und als Laufpuffer für die Elektrophorese wurden die unten angegebenen Lösungen verwendet. Die Aktivität der PGK wurde mit der rückläufigen Glycolysereaktion bestimmt (6). Zudem werden die bei den Elektrophoresen verwendeten Spannungen, Laufzeiten und Auftragspunkte angegeben.



2. 2. 1. Lactatdehydrogenase (LDH)

EC 1.1.1.27

Elektrophoresepuffer (Menge für 5 l)

50 mM Diethylbarbitursäure Na.-Salz (Merck 6318) 51,55 g
mit NaOH eingestellt auf pH 8,6

Entwicklungslösung

600 µl Tris-Lactat Puffer

350 mM Milchsäure (Merck 366)

300 mM Tris-Puffer (Roth 4855) 0,24 g mit KOH (Merck
5033) auf pH 9 einstellen, mit H₂O auf 15 ml auffüllen

165 mM NAD (Boehringer 127990) 0,33 µmol in 20 µl H₂O

30 µl Hydrazinhydrat (Sigma H 0883)

oder

600 µl TRAP 144 100 mM pH 7,6

100 mM Pyruvat (Boehringer 128147) 3 µmol in 30 µl H₂O

14 mM NADH (Boehringer 107735) 0,28 µmol in 20 µl

Laufzeit: 30 min bei 200 V

Auftragsstelle: Mitte zwischen Anode und Kathode

2. 2. 2. Phosphoglyceratkinase (PGK)

EC 2.7.2.3

Elektrophoresepuffer (Mengen für 5 l)

20 mM Diethylbarbitursäure Na.-Salz (Merck 6318) 20,62 g

10 mM Na-Citrat (Merck 6448) 14,71 g

5 mM MgSO₄ (Merck 5886) 6,14 g

2 mM EDTA (Merck 8418) 3,72 g

pH 8,2...8,7

Entwicklerlösungen

PGK - Färbemix

400 μ l TRAP 144

200 μ l PD 133

20 μ l HK 133

10 μ l Enzymmix 141

PGK Enzymmix 141

20 μ l Aldolase (Boehr. 102644) 90 U/ml

10 μ l GDH (Boehr. 127779) 170 U/ml

10 μ l GAPDH (Boehr. 105694) 800 U/ml

10 μ l Hexokinase (Boehr. 127817) 1400 U/ml

10 μ l G-6-PDH (Boehr. 127035) 350 U/ml.

PD 133

10 ml 100 mM TRAP pH 7,6

40 mM $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ (Merck 5099) 91 mg

40 mM FBP (Boehr. 104795) 220 mg

1,3 mM NADH (Boehr. 15300) 9 mg

mit ca. 10 μ l 2n NaOH auf pH 7,6 einstellen

HK 133

5 ml TRAP 150 mM pH 9,2 (2,238 g TRA-HCl auf 100 ml H_2O)

150 mM Glukose $\times H_2O$ (Merck 8342) 15 mg

28 mM ADP (freie Säure, Bohr. 102164) 55 mg

24 mM NADP $\times Na_2$ 98 % (Boehr. 128058) 100 mg

80 mM $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Merck 5886) 100 mg

pH 7,2...7,6

Laufzeit: 90 min bei 200 V

Auftragstelle: Mitte zwischen Anode und Kathode

2. 2. 3. Hexokinase (HK)

EC 2.7.1.1

Elektrophoresepuffer

Kinasenpuffer (2. 2. 2.)

Entwicklerlösungen

500 µl TRAP 144a 100 mM

50 µl 10 mM Glucose D+ Monohydrat (Merck 8342)

40 µl 2,5 mM ATP Na₂-Salz (Boehringer 127523)

10 µl 0,6 mM NADP Na₂-Salz (Boehringer 128031)

10 µl 600 mU G6PDH 1:6 mit BSA 121 verdünnt

Laufzeit: 40 min bei 300 V

Auftragstelle: Nahe an der Kathode

2. 2. 4. Creatin-Kinase (CK)

EC 2.7.3.2

Elektrophoresepuffer

Kinasenpuffer (2. 2. 2.)

Entwicklerlösungen

600 µl Monotest CK NAC aktiviert (Boehringer 126349)

Laufzeit: 30 min bei 200 V

Auftragstelle: Nahe an der Kathode

2. 2. 5. Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI)

EC 5.3.1.9

Elektrophoresepuffer

Kinasenpuffer (2. 2. 2.)

mit NaOH auf pH 8 eingestellt

Entwicklerlösungen

600 µl 100 mM TRAP 144 pH 7,6

10 µl 0,6 mM NADP Na₂-Salz (Boehringer 128031)

5 µl 0,95 mM F₆P Na₂-Salz (Boehringer 104850) 0,59 µmol

5 µl 370 mU G6PDH 1:6 mit BSA 121 verdünnt

Laufzeit: 150 min bei 200 V

Auftragstelle: Nahe an der Anode

2. 3. Puffer

BSA 121

20 ml TRA - HCl 50 mM pH 7,6

6 mg DTE (1,4-Dithioerythrit, Boehringer 223662)

10 mg BSA (bovine serum albumin, Serva Heidelberg, 11920)

BSA 144

BSA 121 und Glycerin 1:2 (Merck 4095)

TRAP 144 (Triethanolamin - HCl, Merck 8379, MG 149,19)

50 mM = 3,73 g ad 500 ml H₂O mit NaOH auf pH 7,6

100 mM = 7,46 g ad 500 ml H₂O mit NaOH auf pH 7,6

TRAP 144a (PGK)

500 ml TRA - HCl 100 mM, pH 7,6

20 mM MgSO₄; 2,46 g ad 500 ml H₂O

2. 4. Elektrophorese

Die Elektrophoresekammern, nach Angaben von Dr. Th. Bücher in der Institutswerkstatt aus Polyvinylchlorid (PVC) gebaut (7), waren wassergekühlt und wurden von einer Thermostat-Pumpe auf 3° unter Raumtemperatur temperiert. Die Elektrophoresegele (Cellogel, gelatinierte Celluloseacetatfolie, 5,7 X 14 cm, Stärke ca. 250 - 300 μ , Chemetron Milano cod 007) wurden 5 bis 10 min in einer Schale mit Elektrophorese-Laufpuffer gewaschen und dann in 250 ml Laufpuffer, in dem 25 mg Dithioerythrit gelöst waren, 5 min inkubiert. Bei Phosphoglyceratkinase-Elektrophoresen wurde zusätzlich noch 45 mg Adenosinmonophosphat zugefügt. Das inkubierte Gel wurde blasenfrei und genau parallel zur Kammerwand auf die Brücke gelegt, festgeklemmt und je 50 ml des Inkubationspuffers in jede der Elektrodenwannen gegeben (Flüssigkeitsspiegelangleich durch Überlauf). Nach vorsichtigem Abtrocknen eventueller Pufferreste auf dem Gel folgte ein Vorlauf unter Elektrophoresebedingungen von 10 min. Zwischenzeitlich wurden von den zu untersuchenden Proben ein Film von 1 μ l auf jede Öse eines Celtec Semimikro-Vierfachstempels gezogen, nach Unterbrechung des Stromes der Stempel auf die Brücke gelegt und die Ösen gleichmäßig und vorsichtig auf das Gel am Startpunkt aufgesetzt. Der Stempel wurde entfernt, die Auftragsstelle markiert, die Elektrophoresekammer staubdicht verschlossen und der Strom wieder angeschaltet. Kurz vor Laufzeitende wurden die Entwicklungslösungen hergestellt und damit eine ca. 5 X 8 cm große Celluloseacetatmembran (Satorius Membranfilter GmbH, Göttingen) staub- und blasenfrei in einer flachen PVC Kammer getränkt. Nach Abschalten des Stromes wurde die Elektrophoresefolie an den Kanten der Brücke mit einer Klinge abgeschnitten und mit der Laufoberseite nach unten auf die Entwicklerfolie gelegt. Blasenfreier Kontakt und genaues Ausrichten parallel zur Kammerkante waren wichtig. Eine dünne Glasplatte schützte die Folien vor Austrocknung und Staub.

Die Entwicklerkammer wurde nun auf den Schlitten des Auswertegerätes gelegt, das Bahn für Bahn mit 365 nm abtastete (Osram HG 15/1 Lampe mit Interferenzfilter 365 nm) und fluoreszierende Banden durch eine optische Linse und einen Spalt (1 X 9 mm) mit einem RCA 1 P 21 Fotomultiplier registrierte. Lampe und Fotomultiplier waren mit einem Eppendorf Photometer 1200 M (Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) mit Schreiber verbunden (7).

Das Abtasten einer Bahn dauerte etwa 55 s, der Spurwechsel 5 s, so daß die vier Bahnen des Gels jeweils im Abstand von einer Minute abgetastet wurden. Nach Beendigung einer Meßserie fuhr der Schlitten in seine Ausgangsstellung zurück und konnte manuell oder rechnergesteuert wieder gestartet werden. Bei Rechnerbetrieb wurden die Daten gespeichert, der erste und vorletzte von acht Durchgängen analog aufgezeichnet, bei allen Durchgängen die Peaks integriert und die Bandenentwicklung mit einer errechneten Korrelationsgeraden verglichen. Eventuelle Störpeaks, Staubkörner etc., wurden automatisch eliminiert, da sie in ihrer Fluoreszenz konstant blieben.

3. EXPERIMENTE

3. 1. Probenbereitung

Die Proben wurden bei 30°C, 20 min und 4470g zentrifugiert (Heraeus-Christ Zentrifuge Typ 4123 mit Ausschwingrotor 040). Der Überstand (Seminalplasma) wurde vorsichtig vom Sediment getrennt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und bei Raumtemperatur 4 min bei 16000g zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge Typ 3200). Dieser Überstand wurde in mehrere Portionen aliquotiert, im Verhältnis 1:2 mit BSA 144 (2.3.) verdünnt und bei -25°C tiefgefroren. Vom Sediment der ersten Zentrifugation wurde möglichst viel des restlichen Seminalplasmas abpipettiert. Das Zentrifugegefäß wurde dann mit 10 ml einer 25°C warmen 0,9%igen Kochsalzlösung aufgefüllt und das Sediment (Spermien) durch vorsichtiges Pumpen (blaue Eppendorf-Pipettenspitze mit abgeschnittenem und rundgeschmolzenem Ende) vermengt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 min mit 4470g (Heraeus-Christ Zentrifuge, Ausschwingrotor) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde routinemäßig zweimal, bei besonderen Untersuchungen mehrmals durchgeführt. Die gewaschenen Spermien, mit einem kleinem Rest 0,9%iger Kochsalzlösung, insgesamt etwa 50 µl, wurden mit 50 µl BSA 144 (2.3.), versetzt mit Digitonin (1mg/ml), verdünnt, gemischt und im Eisbad dreimal 1 s beschallt (Branson Sonic Power, USA, mod S 75, Stufe 3); daraufhin nochmals gemischt und nach etwa 10 min bei Raumtemperatur 4 min mit 16000g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -25°C tiefgefroren. Für ein optimales Elektrophoreseergebnis müssen etwa 70 bis 100 µU Enzymaktivität auf das Gel aufgetragen werden. Um den notwendigen Verdünnungsgrad zu bestimmen, wurden die Enzymaktivitäten der Proben photometrisch gemessen (28; Eppendorf Photometer PCP 6121).

3.2. Probenlagerung und -haltbarkeit

In Übereinstimmung mit der Literatur (21,29,34) nahmen die Aktivitäten der Proben bei oben beschriebener Behandlung in einem Aufbewahrungszeitraum von 14 Tagen nicht signifikant ab. Phosphoglyceratkinase war auch gegenüber mehrmaligem Auftauen und Wiedereinfrieren sehr stabil. Bei der Laktatdehydrogenase hingegen ergab sich mit dieser Prozedur ein Verwischen der Isoenzymbanden im Elektropherogramm, von scharfen Peaks zu einem langgezogenen Klecks mit noch teilweise sichtbaren Intensitätsmaxima bei kaum oder mäßig verringerter Gesamtaktivität.

3. 3. Elektropherogramme

Im folgenden werden typische Beispiele für Elektropherogramme (Skizzen) und Densitogramme der Laktatdehydrogenase (LDH), Phosphoglyceratkinase (PGK), Hexokinase (HK), Creatinkinase (CK) und Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI) aus Spermatozoen und Seminalplasma gezeigt. Die Auftragstellen sind mit $\bar{P}$ markiert, die Anode wird mit $(+)$, die Kathode mit $(-)$ angegeben. Die Banden der spermienspezifischen Isoenzyme LDH-C₄ und PGK-2 wurden gekennzeichnet. Bei der HK und CK wurde Herzmuskel als Vergleichsorgan herangezogen.

3. 3. 1. L D H

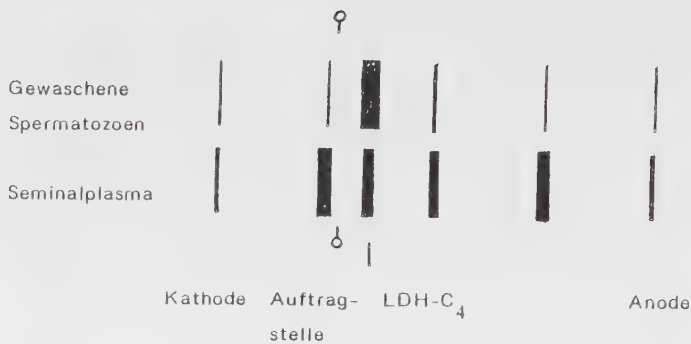


Abb. 3. 3. 1. 1. Skizze einer LDH - Elektrophorese

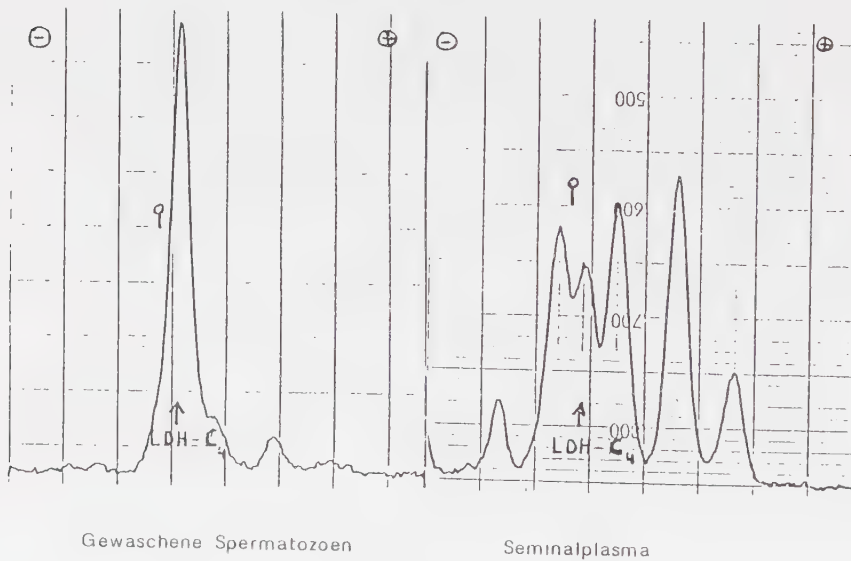


Abb. 3. 3. 1. 2. Densitogramme einer LDH - Elektrophorese zu
Abb. 3,3,1,1.

3. 3. 2. P G K

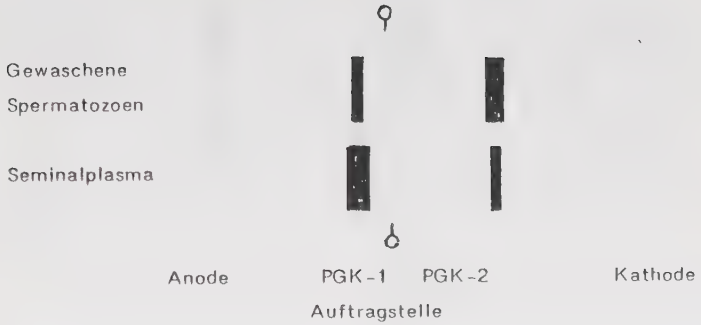


Abb. 3. 3. 2. 1. Skizze einer PGK - Elektrophorese

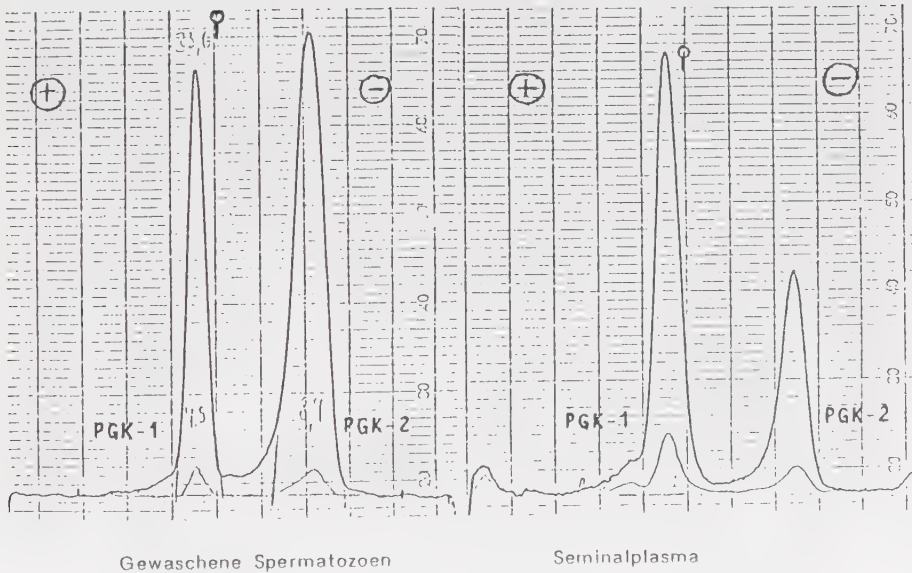


Abb. 3. 3. 2. 2. Densitogramme einer PGK - Elektrophorese zu

Abb. 3.3.2.1.

3. 3. 3. H K



Abb. 3. 3. 3. 1. Skizze einer HK - Elektrophorese

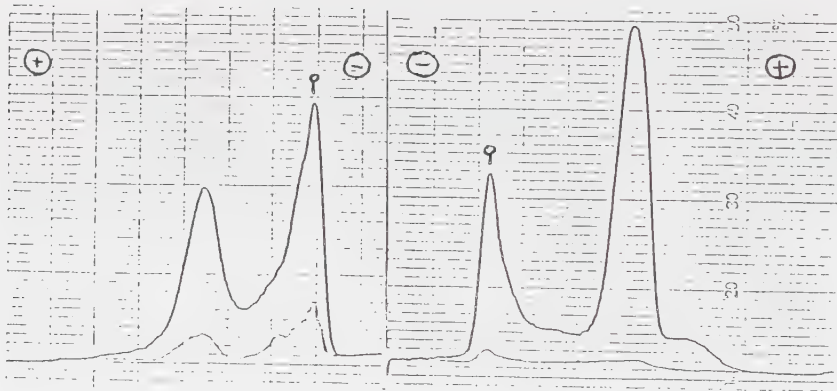


Abb. 3. 3. 3. 2. Densitogramme einer HK - Elektrophorese zu
Abb. 3.3.3.1.

3. 3. 4. C K



Abb. 3. 3. 4. 1. Skizze einer CK - Elektrophorese

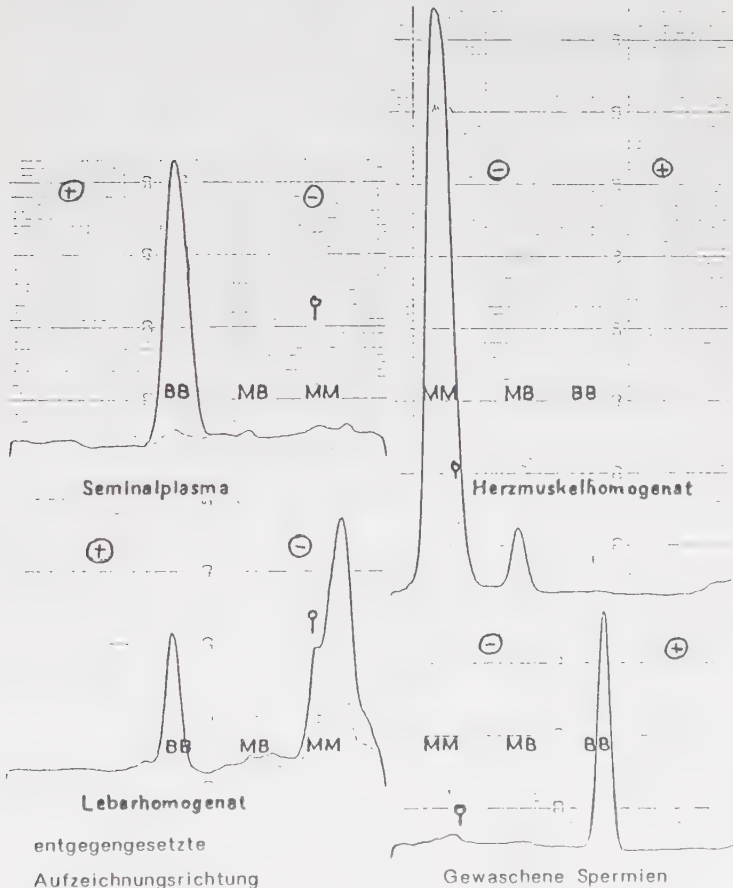


Abb. 3. 3. 4. 2. Densitogramme einer CK - Elektrophorese zu

Abb. 3.3.4.1.

3. 3. 5. G P I



Abb. 3. 3. 5. 1. Skizze einer GPI - Elektrophorese

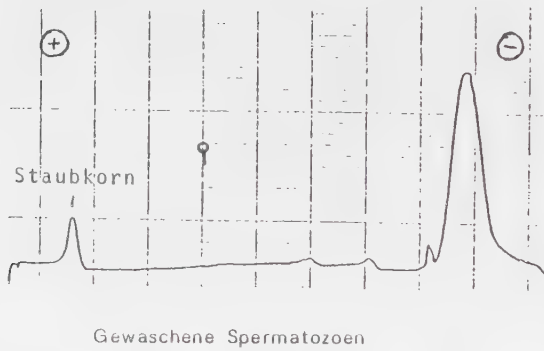


Abb. 3. 3. 5. 2. Densitogramm einer GPI - Elektrophorese zu
Abb. 3. 3. 5. 1.

3. 4. Variantensuche

Für diese Arbeit wurden bei 278 Ejakulaten die Elektrophogramme von LDH und PGK auf unterschiedliches Verhalten in Laufgeschwindigkeit und Laufrichtung der Banden ausgewertet. Es konnte keine Abweichung, also keine Variante mit diesen Kriterien, gefunden werden. Dank der ausgezeichneten Elektrophorese-Methodik (scharfe Banden, gute Auflösung und Reproduzierbarkeit) hätten solche Abweichungen erkannt werden können.

Ein Polymorphismus kann also für die menschliche LDH und PGK in Spermien und Seminalplasma ausgeschlossen werden. Wheat und Goldberg haben eine nicht genannte Anzahl Spermaproben untersucht. 1978 publizierten sie erstmals (44) nach Untersuchung von 41 Human-Hoden eine Variante der LDH - C_4 , die in der Elektrophorese (Abb. 3. 4.) weiter zur Kathode wanderte als der Wildtyp. Weitere Informationen über diese Variante wurden nicht publiziert.

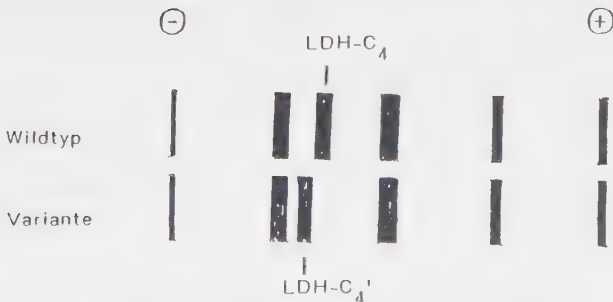


Abb. 3. 4. Skizze der Banden eines LDH Isoenzymusters in einer Seminalplasmaprobe und des Isoenzymusters der LDH - C_4 Variante (44)

3. 5. Antikörperversuch

Die Elektropherogramme der Homogenate gewaschener Spermien zeigten zwei Banden mit Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität. Für die Zuordnung dieser beiden Banden zu somatischer PGK (PGK-1) und der spermspezifischen PGK (PGK-2) wurden verschiedene Organe (Herz, Leber, Skelettmuskel), in denen nur PGK-1 exprimiert wird, als Referenz untersucht. Dabei zeigte sich, daß es sich bei der zur Anode wandernden Form um die PGK-1, bei der schneller zur Kathode wandernden Form um die PGK-2 handelte.

Ein weiterer Versuch zur Identifizierung wurde mit in Hühnern induzierten Antikörpern gegen somatische Human-PGK durchgeführt. Der Anti-PGK-1-Antikörper wurde zu aufbereiteten Proben gewaschener Spermien und Gewebshomogenaten vergleichbarer PGK-Aktivität zugegeben und verschieden lange bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden vorher und nachher photometrisch (Tab.3.5.) und elektrophoretisch (Abb. 3.5.1. und 3.5.2.) ausgewertet.

Tab. 3. 5. zeigt die prozentualen Restaktivitäten der Proben bei verschieden langer Inkubationsdauer mit Antikörpern im Vergleich zu den Proben ohne Antikörperzugabe (=100%)

Inkubationszeit (h)	1	2	18
Spermien +H ₂ O	100	100	100
Spermien +Antikörper	66	48	54
Herzmuskel +H ₂ O	100	100	100
Herzmuskel +Antikörper	41	12	11,3

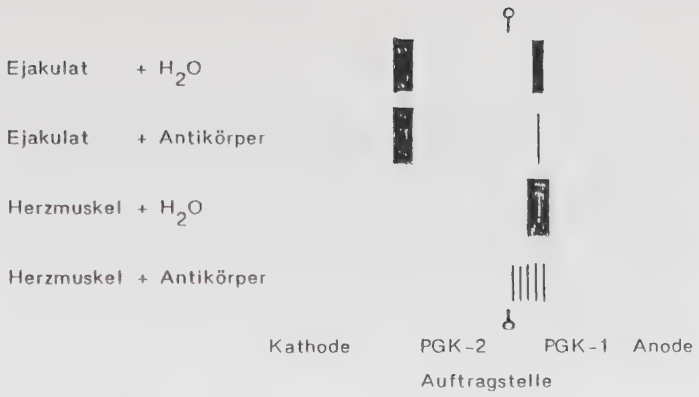


Abb. 3. 5. 1. Skizze einer PGK-Elektrophorese mit antikörper-behandelten Proben

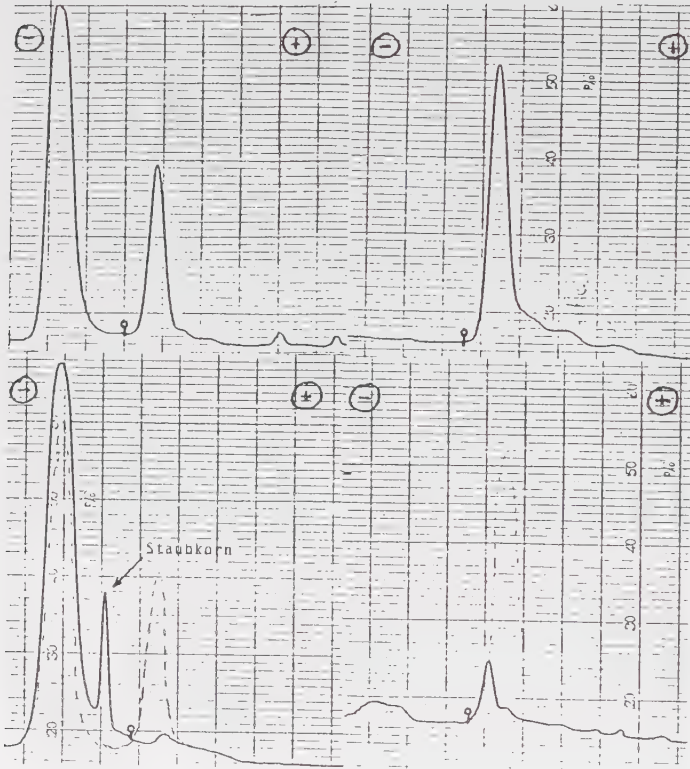
Spermien + H₂O

Herzmuskel + H₂O

PGK-2

PGK-1

PGK-1



PGK-2

Spermien + Antikörper

Herzmuskel + Antikörper

Abb. 3. 5. 2. Densitogramme der PGK-Elektrophoresen mit und ohne anti - PGK-1 Antikörper zu Abb. 3. 5. 1.

3. 6. Waschversuche

Bei den Elektrophoresen wurden, nach Routinebehandlung der Ejakulate (zweimaliges Waschen), immer ein Anteil (10 - 34%) somatischer PGK und LDH in der Spermienfraktion gefunden. Um auszuschließen, daß es sich hierbei um Verunreinigungen mit Seminalplasma handelte, wurde mit sieben Ejakulaten ein umfangreiches Waschverfahren durchgeführt. Für diese Waschversuche wurden Proben von vier Patienten der andrologischen Ambulanz (V18/1 - V18/4) und drei gesunden Probanden (V24/1 - V24/3) verwendet. In Tabelle 3. 6. sind die morphologischen Kriterien der Ejakulate angegeben. Die Proben V18/1 mit V24/3 wurden viermal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen, V24/3 zusätzlich zweimal mit hypertonischer Kochsalzlösung (2%), wobei nach jedem Waschvorgang ein Aliquot der Probe und des Waschpuffers für die Elektrophorese abgezweigt wurde. Durch diese Waschvorgänge konnten Verunreinigungen durch Reste des Seminalplasmas ausgeschlossen werden (Tab. 3. 6.). Vielmehr mußten sogenannte Cytoplasmatröpfchen als Ursache der "Verunreinigungen" angenommen werden. Diese cytoplasmatischen Tröpfchen entstehen während der Spermiogenese (29). Sie liegen als schmaler, von einer Membran umgebener Saum um das Mittelstück der Human-Spermien (Abb. 3. 6. 1.). Bei Bulle (Abb. 3. 6. 3. - 3. 6. 6.), Ziegenbock (Abb. 3. 6. 3. - 3. 6. 6.) und Eber (Abb. 3. 6. 2.) sind diese Cytoplasmatröpfchen sehr locker an die Spermien angelagert, hier läßt sich auch mit nur einem Waschvorgang eine sehr saubere Trennung des Seminalplasmas und der Cytoplasmatröpfchen von den Spermien erzielen, so daß man in der Spermienfraktion nur die spermienspezifischen Isoenzyme findet (15,29,31).

Tab. 3. 6. Ergebnisse der Waschversuche

Anteile somatischer PGK an gesamt PGK (%)							
Proband Nr.	V18/1	V18/2	V18/3	V18/4	V24/1	V24/2	V24/3
Sperm nach							
1 x Waschen					33,3	32,8	24,5
2 x Waschen					24,0	33,6	23,6
3 x Waschen	34,1	39,6	27,1	21,1	44,4	47,5	22,0
4 x Waschen					38,1	42,8	20,6
1 x zus. 2%							25,0
2 x zus. 2%							32,8
Plasma zentrifug.							
20 min. 4470g	79,4	77,6	78,6	68,8	78,8	60,2	66,2
2 min. 160000g					86,0	65,7	69,2
Waschpuffer nach							
1 x Waschen							39,8
2 x Waschen							21,4
3 x Waschen							30,0
4 x Waschen							26,2
Morphologie:							
Motilität (%)	V18/1	V18/2	V18/3	V18/4	V24/1	V24/2	V24/3
lebhaft	10	20	10	10	30	40	40
langsam	30	30	30	40	20	30	30
unbeweglich	60	50	60	50	50	30	30
Dichte ($\times 10^6/\text{ml}$)	144,6	51,5	88,9	74,9	70,2	68,8	79,6
Rundzellen	6-8	8-12	6-8	3-4	1-5	1-5	1-5

Anteile somatischer LDH an gesamt LDH (%)

Proband Nr.	V18/1	V18/2	V18/3	V18/4	V24/1	V24/2	V24/3
Sperm nach							
1 x Waschen					18,9	29,9	15,8
2 x Waschen					18,5	24,1	9,8
3 x Waschen	21,2	17,1	12,1	17,5	18,2	23,8	9,4
4 x Waschen					14,3	20,5	12,1
1 x zus. 2%							6,0
2 x zus. 2%							9,7
Plasma zentrifug.							
20 min. 4470g	75,3	72,3	85,8	72,3	85,1	82,4	78,5
2 min. 160000g					80,4	68,9	73,8
Morphologie:	V18/1	V18/2	V18/3	V18/4	V24/1	V24/2	V24/3
Motilität (%)							
lebhaft	10	20	10	10	30	40	40
langsam	30	30	30	40	20	30	30
unbeweglich	60	50	60	50	50	30	30
Dichte ($\times 10^6$ /ml)	146,6	51,5	88,9	74,9	70,2	68,8	79,6
Rundzellen	6-8	8-12	6-8	3-4	1-5	1-5	1-5



Abb. 3. 6. 1. Cytoplasmatröpfchen am Humanspermium
(mit freundlicher Genehmigung von Dr. E. Töpfer)

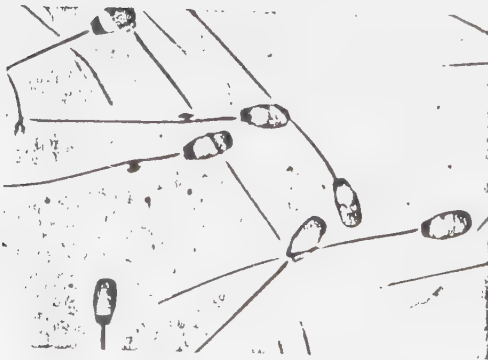


Abb. 3. 6. 2. Cytoplasmatröpfchen an Eberspermien (29)

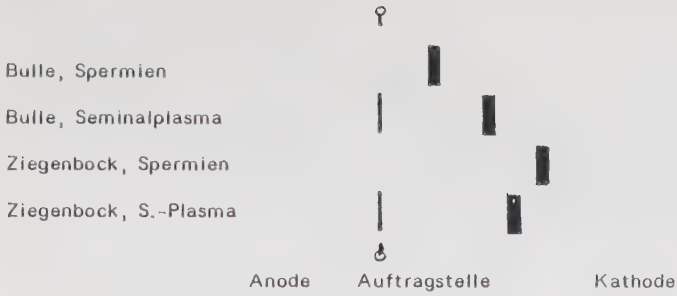


Abb. 3. 6. 3. Skizze einer LDH-Elektrophorese von Bullen
Spermien und Seminalplasma und Ziegenbock
Spermien und Seminalplasma

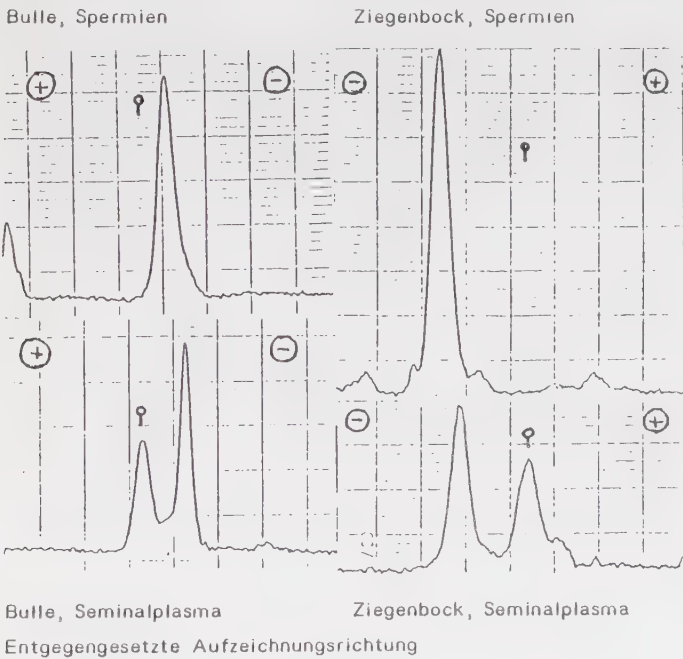


Abb. 3. 6. 4. Densitogramme der LDH-Elektrophorese zu Abb.
3. 6. 3.



Abb. 3. 6. 5. Skizze einer PGK-Elektrophorese von Bullen
Spermien und Seminalplasma und Ziegenbock
Spermien und Seminalplasma

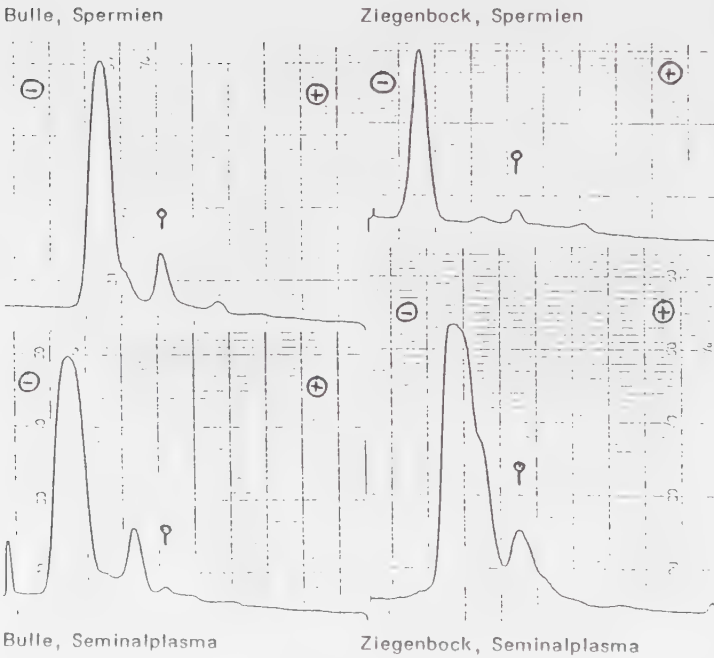


Abb. 3. 6. 6. Densitogramme der PGK-Elektrophorese zu Abb.
3. 6. 5.

4. Korrelation und Statistik

Von 29 Probanden, 23 mit vermutlicher Infertilität und 6 wahrscheinlich fertilen Probanden, wurden die Isoenzyme der LDH und der PGK untersucht und mit den Angaben der andrologischen Ambulanz zur Morphologie in Beziehung gesetzt. Als Untersuchungsmaterial wurde Seminalplasma verwendet, da es leichter und zuverlässiger zu gewinnen ist als eine reine Spermienpopulation, was für eine eventuelle Anwendung als andrologische Routineuntersuchung von Bedeutung wäre. Das Seminalplasma erhält die Aktivität spermienspezifischer Isoenzyme durch leckende Zellmembranen und zugrunde gehende Zellen der Spermatogenese, besonders der Spermatozoen. So sollte der Plasmaspiegel pro ml an spermienspezifischen Isoenzymen mit der Anzahl beschädigter Zellen, und die Anzahl der lecken und sterbenden Zellen mit der Spermien-dichte direkt proportional sein (Tab. 4.1., 4.2.). Es zeigte sich, daß sich mit ansteigender Spermiedichte auch die Enzymaktivität der Gesamt-LDH und der LDH - C₄, weniger der Gesamt-PGK und der PGK - 2 erhöhte.

Tab. 4. 1. Gesamt-LDH Aktivität, der prozentuale Anteil der LDH-C₄ an ihr und die berechnete LDH-C₄ Aktivität im Seminalplasma in Abhängigkeit von der Spermatozoenzahl

Spermatozoen	n	ges.LDH	LDH-C ₄	LDH-C ₄ in ges.LDH
(X10 ⁶ /ml)		(U/ml)	(U/ml)	%
0 < 40	14	0,2 - 0,9	0 - 0,14	0 - 18
$\bar{x} \pm s$		0,53±0,28	0,06±0,05	9,21±5,45
40 ≤ 100	13	0,3 - 0,9	0,06-0,25	14,2-31,1
$\bar{x} \pm s$		0,57±0,20	0,14±0,06	24,08±4,67
100 < 250	3	0,5 - 1,2	0,12-0,28	23 - 27
$\bar{x} \pm s$		0,9±0,36	0,22±0,09	24,9±2,01

Tab. 4. 2. Gesamt-PGK-Aktivität, der prozentuale Anteil der PGK-2 an ihr und die berechnete PGK-2 Aktivität im Seminalplasma in Abhängigkeit von der Spermatozoenzahl

Spermatozoen	n	ges.PGK	PGK-2	PGK-2 in ges. PGK
(x10 ⁶ /ml)		(U/ml)	(U/ml)	(%)
0 < 40	14	0,5 - 5,3	0 - 0,85	0 - 22,2
$\bar{x} \pm s$		1,94±1,26	0,22±0,22	10,33±6,12
40 ≤ 100	13	1,1 - 4,6	0,08-1,2	6 - 34,3
$\bar{x} \pm s$		2,03±0,99	0,45±0,29	22,09±8,19
100 < 250	3	1,45-3,3	0,2 - 0,9	8 - 27
$\bar{x} \pm s$		2,38±0,93	0,47±0,38	18,53±9,67

Neben der Dichte der Spermatozoen im Ejakulat sollte, abgesehen von einem Enzym-Grundspiegel, auch die Zahl unbeweglicher, beschädigter Spermatozoen für einen hohen oder niedrigen Spiegel spermienspezifischer Isoenzyme verantwortlich sein. Es wurde daher versucht, eine Korrelation zwischen der Dichte unbeweglicher Spermatozoen und Enzymaktivität aufzufinden.

Tab. 4. 3. Gesamt LDH-Aktivität, der prozentuale Anteil der LDH-C₄ an ihr und die berechnete LDH-C₄ Aktivität im Seminalplasma in Abhängigkeit der Anzahl unbeweglicher Spermatozoen

% unbewegl. Spermien	n	Dichte (10 ⁶ /ml)	ges.LDH (U/ml)	LDH-C ₄ (U/ml)	LDH-C ₄ (% ges.LDH)
0 < 40	6	2,48-23,88	0,2-0,9	0,01-0,25	5-31,1
$\bar{x} \pm s$ 36,67±5,16		14,48±9,27	0,59±0,3	0,13±0,10	18,72±10,91
40 < 70	16	3,9-106,1	0,28-1,2	0,006-0,28	2-28
$\bar{x} \pm s$ 53,13±4,79		39,74±28,57	0,61±0,26	0,13±0,07	20,53±6,93
≥ 70	7	0,7-50,26	0,2-0,9	0,004-0,17	2-24
$\bar{x} \pm s$ 77,14±9,51		11,54±17,38	0,57±0,28	0,071±0,054	10,86±6,57

Tab. 4. 4. Gesamt PGK-Aktivität, der prozentuale Anteil der PGK-2 an ihr und die berechnete PGK-2 Aktivität im Seminalplasma in Abhängigkeit der Anzahl unbeweglicher Spermatozoen

% unbewegl. Spermien	n	Dichte (10 ⁶ /ml)	ges. PGK (U/ml)	PGK-2 (U/ml)	PGK-2 (%ges.PGK)
0 < 40	6	2,48-23,88	0,5-5,3	0,03-1,2	5-34,3
$\bar{x} \pm s$ 36,67±5,16		14,48±9,27	2,71±1,85	0,63±0,42	21,77±10,86
40 < 70	16	3,9-106,1	0,68-3,7	0,07-0,9	6-31,2
$\bar{x} \pm s$ 53,13±4,79		39,74±28,57	1,97±0,87	0,33±0,20	17,29±7,94
≥ 70	7	0,7-50,26	1,0-2,6	0,04-0,4	1,4-22,2
$\bar{x} \pm s$ 77,14±9,51		11,54±17,38	1,69±0,5	0,18±0,11	11,46±6,66

Die statistischen Berechnungen für diese Arbeit wurden mit Cyber am Leibnitz-Rechenzentrum-München durchgeführt.

Es standen mehrere Methoden der Multivarianzanalyse zur Wahl: Verschiedene Clusteranalysen und u.a. die kanonische Korrelationsberechnung.

Mit dem 1969 von Wishart eingeführten und 1982 zuletzt modifizierten Programm CLUSTAN 2 wurde die eingegebene Wertematrix nach verschiedenen agglomerativen Methoden der hierarchischen Clustertechnik verarbeitet. Kendall und Buckland definierten ein Cluster folgendermaßen: "Ein Cluster ist eine Gruppe benachbarter Elemente einer statistischen Population; zum Beispiel eine Gruppe von Menschen, die in einem Haus leben, Beobachtungen an einer geordneten Gruppe oder eine Gruppe benachbarter Zeichen in einem Feld".

Die Vielzahl der entwickelten Methoden zur Clusteranalyse zeigt, daß es keine für alle Anwendungsbereiche optimale Methode gibt. Verschiedene Berechnungstechniken angewandt auf dieselbe Wertematrix können verschiedene Ergebnisse zeigen. Ist dies nicht nur numerisch, sondern grundsätzlich der Fall, wobei in der Praxis nach "Ward" und einer anderen Methode, oft "nearest neighbour", gerechnet wird, so ist die Clusteranalyse für das behandelte Problem nicht anwendbar (Dr. Wiseman, LRZ-München).

Da die Berechnungen nach "Ward" und nach dem "nächsten Nachbarn", die virtuelle Korrelationswerte ergaben, und Berechnungen mit einem Programm, das Korrelationsquotienten zwischen +1 und -1 erstellte, völlig verschiedene Ergebnisse erbrachten, wurde nach einer anderen Möglichkeit der Multivarianzanalyse gesucht. Es bot sich ein "canonical correlations" genanntes Programm aus dem SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) an.

Als Variable der Wertematrix wurden vier morphologische Parameter (SP1 - SP4), vier gemessene (Uml1 - Uml4) und zusätzlich vier daraus berechnete (X1 - X4) biochemische Parameter der 29 Probanden angegeben (Tab. 4.5.).

Tab. 4. 5. Die Variablen der Wertematrix, Mittelwert und Standardabweichung.

Variable	Mittelwert	Standardabw.
SP1 = Gesamt-Spermiendichte ($10^6/\text{ml}$)	19,0386	26,1901
SP2 = Dichte lebhaft bew. Sp. ($10^6/\text{ml}$)	4,2955	7,8773
SP3 = Dichte langsam bew. Sp. ($10^6/\text{ml}$)	4,2014	6,2391
SP4 = Dichte unbew. Spermien ($10^6/\text{ml}$)	10,5407	14,3408
Uml1 = Aktivität Gesamt-LDH (U/ml)	0,2655	0,3015
Uml2 = Aktivität der LDH- C_4 (U/ml)	0,0452	0,0541
Uml3 = Aktivität Gesamt-PGK (U/ml)	1,0414	1,2771
Uml4 = Aktivität der PGK-2 (U/ml)	0,1593	0,2572
X1 = % LDH/ C_4 an Gesamt-LDH	8,8966	10,1992
X2 = % PGK-2 an Gesamt-PGK	7,5069	9,3162
X3 = Relation ges. PGK zu ges. LDH	2,2621	3,2062
X4 = Relation PGK-2 zu LDH/ C_4	2,1141	3,3771

Die Korrelationskoeffizienten wurden für jede Beziehung der 12 Variablen untereinander errechnet (Tab. 4.6.), die Erklärung der Abkürzungen ist in Tab. 4.5. gegeben.

Tab. 4. 6. Die Korrelationskoeffizienten der Variablen

	SP1	SP2	SP3	SP4	Uml1	Uml2	Uml3	Uml4	X1	X2	X3	X4
SP1	1,00000											
SP2	0,85237	1,00000										
SP3	0,87361	0,56995	1,00000									
SP4	0,97782	0,75921	0,84718	1,00000								
Uml1	0,58995	0,35037	0,54142	0,64939	1,00000							
Uml2	0,82336	0,57172	0,73690	0,86902	0,88725	1,00000						
Uml3	0,68246	0,55694	0,69656	0,63737	0,78383	0,77433	1,00000					
Uml4	0,66920	0,58865	0,72670	0,58259	0,43402	0,55483	0,84173	1,00000				
X1	0,91044	0,74375	0,83744	0,88976	0,73045	0,90731	0,80698	0,73729	1,00000			
X2	0,76726	0,66091	0,68601	0,73965	0,58139	0,67612	0,72542	0,84378	0,81966	1,00000		
X3	0,65178	0,56747	0,73787	0,55753	0,47222	0,54401	0,88019	0,94350	0,75401	0,76837	1,00000	
X4	0,51553	0,44562	0,60326	0,43420	0,33763	0,36187	0,73705	0,92153	0,59637	0,82779	0,91927	1,000

5. DISKUSSION

Von den Enzymen der Glycolyse sind spermien-spezifische Isoenzyme der HK, LDH und PGK bekannt. Auf der Cellogel Celluloseacetatfolie ließ sich die LDH-C₄ sehr gut von den anderen LDH Isoenzymen abtrennen (Abb.3.3.1.2.), das gleiche gilt für die Trennung der PGK-2 und der PGK-1 (Abb.3.3.2.2.). Bei LDH - Elektropherogrammen der gewaschenen Spermienproben entfielen 70 - 94% der Aktivität auf die LDH-C₄. Die anderen Isoenzymbanden waren nur schwach erkennbar, aber immer vorhanden. Die LDH-C₄ Bande lag etwas anodenwärts der Auftragstelle zwischen LDH-3 und LDH-2, näher zu letzterer, und hatte im Seminalplasma einen Aktivitätsanteil von 14 - 31%. Die PGK-2 hatte bei den Elektropherogrammen der gewaschenen Spermien einen Aktivitätsanteil von 53 - 80%, im Seminalplasma von 14 - 40%. Sie lief auf dem Gel etwa doppelt so weit und entgegengesetzt, zur Kathode, wie die PGK-1. Für die HK konnten leider keine geeigneten Elektrophoresebedingungen mit ganz befriedigender Reproduzierbarkeit erarbeitet werden. Die Variantensuche wurde an 278 Ejakulatproben von gesunden, wahrscheinlich fertilen Personen und Patienten der andrologischen Ambulanz der dermatologischen Klinik der LMU-München für LDH und PGK durchgeführt.

Wheat fand 1978 (44) nach Untersuchung von 41 autopsisch gewonnenen Human-Hodenproben eine LDH-C₄ Variante, doch haben weder er und Goldberg (17,18,19) nach Untersuchung einer nicht genannten Anzahl von Human-Ejakulaten, noch Schmechta mit 198 untersuchten Proben (34) oder Gerez de Burgos mit 90 untersuchten Proben (9) von einer anderen Variante berichtet. Krietsch fand 1975 nach Untersuchung von 3000 Blutproben eine Variante der PGK-1, die PGK - München (24,25,26,27). Für die PGK-2 wurde eine Variantensuche zum erstenmal durchgeführt.

Die elektrophoretischen Untersuchungen der 278 Ejakulatproben zeigten keine Variante der somatischen LDH, LDH-C₄, PGK-1 oder PGK-2. Damit kann beim Menschen, im Gegensatz zur Maus, ein Polymorphismus bei diesen Isoenzymen ausgeschlossen werden.

Bei allen elektrophoretischen Untersuchungen vom Seminalplasma getrennter Spermien zeigte sich, daß immer somatische Isoenzyme (6 - 48%) nachweisbar waren. Als mögliche Ursachen der "Verunreinigung" standen Seminalplasmareste, sogenannte Rundzellen (also Zellen, die keine Spermien sind), Cytoplasmatröpfchen (15,29,31) oder eben das physiologische Vorkommen dieser Enzyme in Spermien zur Diskussion.

Mögliche Seminalplasmareste wurden durch aufwendige Waschversuche, die zuerst mit temperierter 0,9%iger, dann zusätzlich mit hypertoner (2%) Kochsalzlösung durchgeführt wurden, abgetrennt. Die Konstanz der somatischen Enzyme im Spermienhomogenat und im Waschpuffer ließ diese Möglichkeit unwahrscheinlich werden, es hätte sich zumindest eine exponentielle Aktivitätsabnahme von Waschgang zu Waschgang zeigen müssen.

Cytoplasmatröpfchen treten bei vielen Spezies auf, sind beim Menschen unter der Spermienmembran angelagert und lichtmikroskopisch nicht oder nur schlecht zu erkennen (Abb. 4.3.1.); bei anderen Spezies sind sie locker an die Membran geheftet (Abb. 4.3.2.).

Die Zerstörung der Membran durch die mechanische Belastung beim Waschen und die dabei auftretende Lyse der Spermien könnte eine Erklärung für die kontinuierliche Abgabe der somatischen Enzyme aus Cytoplasmatröpfchen sein, aber auch das physiologische Vorkommen dieser Enzyme im Energiestoffwechsel der Spermien bedeuten. Die Waschvorgänge sind, auch bei noch so vorsichtigem Vorgehen, wie die Verwendung temperierter, isotoner und gepufferter Waschmedien und das weitgehende Vermeiden großer Beschleunigungen in Rüttlern oder um Pipettenspitzen, sehr schädlich für die Spermienpopulation.

Eine Unversehrtheit der Spermien läßt sich lichtmikroskopisch nur insofern erkennen, als man annehmen darf, daß sich nur unverletzte Spermien lebhaft bewegen. Daraus erklärt sich auch die Fragwürdigkeit quantitativer biochemischer Untersuchungen von Spermien. Recht gut läßt sich jedoch im Lichtmikroskop ein allgemeiner Überblick gewinnen über die behandelte Spermienpopulation. Hier zeigt sich, daß die sogenannten Rundzellen nicht für das Auftreten der somatischen Isoenzyme verantwortlich sein können, weil sie in Ausstrichen der Waschstufen bald nicht mehr zu sehen waren. Es war erstaunlicherweise festzustellen, daß doch einige Spermien nach etwa 10 Stunden, diversen Waschvorgängen und Stehenlassen bei Raumtemperatur, sich noch bewegten. Woher deren Energiereserven kommen, wird noch zu untersuchen sein.

Die LDH-C₄ wird von verschiedenen Autoren in die großen Mitochondrien des Mittelstückes (29), aber auch extramitochondrial lokalisiert (16). Bei Mäusen, in denen Antikörper gegen LDH-C₄ induziert wurden, sank die Fertilitätsrate signifikant ab. Im Gegensatz dazu bleibt bei Induktion von PGK-2-Antikörpern in Mäusen deren Fertilität unbeeinflusst (G.Haedenkamp et al.). Der Ort mit der höchsten PGK-2-Aktivität im Spermium ist bis jetzt noch nicht ermittelt, der Nachweis mit fluoreschromierten Antikörpern, der bei der LDH-C₄ gut gelingt, bereitet bei der PGK-2, möglicherweise aufgrund der Lokalisation, große Schwierigkeiten.

Die Identifizierung der in den Homogenaten gewaschener Spermien elektrophoretisch aufgefundenen PGK-1 wurde mit Antikörpern durchgeführt. Der aus Hühnerserum isolierte Anti-Human-PGK-1-Antikörper heftete sich spezifisch an das somatische Isoenzym an und hemmte seine Aktivität. Ein Maximum der Hemmung war bei Inkubation bei Raumtemperatur nach maximal 2 h erreicht. Nach 1 h betrug die Restaktivität beim Herzmuskel noch 41%, nach 2 h und 18 h nur noch etwa 12%.

Die Gesamt-PGK-Aktivität des Spermienhomogenates wurde nach 1 h auf 66%, nach 2 h auf 48% und nach 18 h auf 54% der Aktivität des Vergleichsansatzes gehemmt. Die sich auf dem Elektropherogramm schwach anfärbenden Stellen in den Bahnen der gehemmten Enzyme stammen möglicherweise von während der Elektrophoresedauer zerfallenden PGK-1-Antikörperkomplexen.

Die PGK-1 des Spermienhomogenates verhielt sich elektrophoretisch und gegenüber dem Antikörper genauso wie die PGK-1 des Herzmuskelhomogenates, kann also als identisch angesehen werden.

Die Verwendung eines spezifischen Anti-PGK-1-Antikörpers könnte in der andrologischen Routine zur einfachen photometrischen Bestimmung der Aktivität der spermspezifischen PGK-2 im Seminalplasma dienen, wenn sich ein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Fertilitätsparametern finden ließe.

Die Aussage, ein Proband sei fertil, oder bisher versagter Kinderwunsch gehe zu seinen Lasten, ist, außer bei offensichtlichen Befunden wie Azoospermie, sehr schwierig zu treffen. Es besteht zwar ein Zusammenhang zwischen Fruchtbarkeit und Spermiedichte und-motilitäten, jedoch mit unscharfen Grenzen. Andererseits ist die Aufgabe und somit der Aufbau des Spermiums so vielschichtig, daß man auch bei der Makellosigkeit einiger morphologischer Parameter eine Fruchtbarkeit nicht unbedingt voraussetzen darf.

Die Bestimmung der Güte und voraussichtlichen Fertilität eines Ejakulates anhand mikroskopischer Untersuchungen mit Auszählen der Gesamtmenge und der lebhaft-, teilweise- oder nicht-beweglichen Spermien, sowie sonstiger Zellen, erfordert von einem erfahrenem Stab technischer Angestellter eine Menge an Zeit und Konzentration. Es ist daher nicht verwunderlich, daß nach Alternativmethoden oder zusätzlichen Aussagemöglichkeiten auf biochemischem Boden gesucht wird, um die Methodik zu vereinfachen, einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen und vielleicht die Richtigkeit einer Aussage zu erhöhen.

Eine genau definierte Spermienpopulation zu gewinnen, in der sich keine Reste des erheblich enzymhaltigen Seminalplasmas befinden, wäre der nächste Schritt.

Wenn die Spermien mit der beschriebenen Waschprozedur (3.2.) behandelt wurden, sind diese zwar weitgehend vom Seminalplasma befreit (Cytoplasmatröpfchen sind ja, wie gezeigt, unter der Membran), die Population ist aber nicht mehr genau definiert. Der Waschvorgang strapaziert die Spermien dermaßen-erfahrene Andrologen sprechen von Verlusten pro Waschgang von 10% bis 50% (29)-, ist kaum reproduzierbar und zudem sehr aufwendig, daß sich die Spermienpräparation in der andrologischen Routine nicht anbietet.

Einfacher zu gewinnen ist ein weitgehend zellfreies Seminalplasma. Zu seiner Verwendung in der Biochemie führte die Überlegung, daß Zellmembranen bisweilen lecken oder Zellen zugrunde gehen. Hierbei wird der Zellinhalt an das Plasma abgegeben. Die Aktivitäten der im Seminalplasma nachweisbaren spermienpezifischen Isoenzyme sollten dann direkt proportional der Anzahl der beschädigten Zellen sein.

Von 29 zufällig ausgewählten Seminalplasma Proben der andrologischen Ambulanz der dermatologischen Universitätsklinik München wurden die Enzymaktivitäten der Gesamt LDH, der LDH-C₄, der Gesamt PGK und der PGK-2 untersucht. Die biochemischen und morphologischen Parameter der Proben wurden mit einer Multivarianzanalyse nach der Methode der kanonischen Korrelation in Beziehung zueinander gesetzt; erstmals wurden die Beziehungen nicht nur zwischen den beiden Gruppen, morphologischen- und biochemischen Parametern, sondern auch unter den Gruppenmitgliedern hergestellt.

Die engste Korrelation überhaupt, mit $r = 0,98$ bestand zwischen der Gesamtspermien-dichte und der Dichte unbeweglicher Spermien. Beide Dichteangaben sind relativ "sichere" Werte der andrologischen Ambulanz. Es scheint also für wahrscheinlich

fertile und für nicht fertile Männer gleich zu gelten, daß eine hohe Dichte aller Spermien auch gleichsinnig eine hohe Dichte der unbeweglichen Spermien bedeutet. Die Unterscheidung und Grenze zwischen langsam- und lebhaft beweglichen Spermien könnte eher fließend, vom Untersucher abhängig sein. So ergab sich ein ziemlich enges Verhältnis (r um 0,85) zwischen Gesamtspermiendichte und den Dichten der beiden Motilitätsstufen beweglicher Spermien, die aber untereinander mit $r = 0,57$ nicht viel gemein hatten. Mit $r = 0,85$ korrelierte auch die Dichte der unbeweglichen Spermien mit der der langsam beweglichen enger als mit der Dichte der lebhaft beweglichen Spermien ($r = 0,76$), was auch verständlich erschien, betrachtet man zumindest einen Großteil der langsam beweglichen Spermien als beschädigt und bald unbeweglich. Erstaunlich war die weit niedrigere Korrelation der Dichte der lebhaft beweglichen Spermien mit der Dichte der langsam beweglichen als mit der Dichte der unbeweglichen Spermien, wo eher eine hohe, aber negative Korrelation erwartet wurde.

Die Enzymaktivitätskorrelationen untereinander ergaben mit $r = 0,89$ zwischen Gesamt-LDH- und LDH-C₄-Aktivität und mit $r = 0,84$ zwischen Gesamt-PGK- und PGK-2 - Aktivität enge Beziehungen, weniger enge mit $r = 0,78$ zwischen Gesamt-LDH- und Gesamt-PGK- Aktivität und mit $r = 0,77$ zwischen LDH-C₄- und Gesamt-PGK- Aktivität, während völlige Dissoziation zwischen LDH- und LDH-C₄- Aktivität einerseits und PGK-2 - Aktivität andererseits bestand. Die PGK-2 scheint sich also, aufgrund ihrer wahrhaft vorhandenen Aktivität oder einer besonderen Lokalisation und Freisetzung etwas gegenüber dem somatischen Isoenzym und mehr gegenüber allen LDH - Isoenzymen abzuheben. Grundsätzlich aber bedeutete eine hohe Aktivität aller Isoenzyme auch eine hohe Aktivität des spermienspezifischen Isoenzyms. Eine krasse Ausnahme bilden Seminalplasmen von Probanden mit Azoospermie, wo, in Übereinstimmung mit der Literatur (9,29,34), außer den somatischen keine

spermispezifischen Isoenzyme der LDH und PGK nachweisbar waren.

Neben den direkt gemessenen oder ausgezählten Parametern wurden erstmals auch Verknüpfungen biochemischer Werte in die Korrelationsberechnungen aufgenommen. Hier läßt ein hohes Enzymaktivitätsverhältnis von Gesamt-PGK zu Gesamt-LDH ein hohes Verhältnis der PGK-2 zur LDH-C₄ erwarten ($r = 0,92$). Bei einem hohen prozentualen Anteil der LDH-C₄-Aktivität an der Gesamt-LDH-Aktivität ist (mit $r = 0,82$) ein hoher Prozentsatz der PGK-2 an der Gesamt-PGK wahrscheinlich.

In der Literatur (9,34) wurden bisher Korrelationsberechnungen veröffentlicht, die sich, bei der LDH, auf das Verhältnis aller Isoenzyme oder der LDH-C₄ zur Gesamtspermiedichte oder zur Dichte einzelner Spermienfraktionen bezogen. Sie decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur bei den Verhältnissen der Gesamtspermiedichten zu absoluten oder relativen Enzymaktivitäten. Die höchsten Koeffizienten ($r = 0,82$) ergaben die Korrelationsberechnungen Gesamtspermiedichte zur LDH-C₄-Aktivität und, wie erwartet und im Widerspruch zur Literatur, der Dichte der unbeweglichen Spermien zur LDH-C₄-Aktivität ($r = 0,87$). Die Aktivität der Gesamt-LDH zeigte zu den Spermiedichteparametern niedrige Korrelationsniveaus zwischen $r = 0,35$ (lebhaftes Spermien) und $r = 0,65$ (unbewegliche Spermien) und lag somit immer rund 0,2 Punkte unter den Werten für die LDH-C₄-Aktivität.

Zum ersten Mal wurden die Enzymaktivitäten der PGK-Isoenzyme in Seminalplasmen in Korrelationsberechnungen einbezogen. Die Rechenergebnisse lagen zwischen denen für die Gesamt-LDH und die LDH-C₄, ohne besondere Signifikanzniveaus zu erreichen. Auffallend war der sehr niedrige Koeffizient des Verhältnisses der PGK-2-Aktivität zur Dichte unbeweglicher Spermien mit $r = 0,58$ (LDH-C₄ $r = 0,87$). Eine hohe Dichte unbeweglicher Spermien

gab anscheinend meist eine hohe Aktivität an LDH-C₄, selten eine hohe Aktivität an PGK-2 an das Seminalplasma ab. Ob dieses Ergebnis durch eine besondere Lokalisation der PGK-2 bedingt ist, wird noch zu untersuchen sein.

Die Enzymaktivitätsverhältnisse von Gesamt- PGK zu Gesamt-LDH und von PGK-2 zu LDH-C₄ scheinen keine Beziehung zu Dichteparametern der Spermien in den Ejakulaten zu haben. Die PGK-2- Aktivität korrelierte mit $r = 0,94$ sehr hoch mit dem Verhältnis der Gesamt- PGK zur Gesamt- LDH, um 0,1 Punkte höher als mit der Gesamt PGK- Aktivität und um vieles höher als mit der Gesamt- LDH- Aktivität ($r = 0,43$).

Für die Beurteilung der Güte eines Ejakulates, als Kriterium sei die Dichte der lebhaft beweglichen Spermien genommen, eignen sich die Werte der Enzymaktivitäten allein nicht; sehr wohl darf man von einer hohen LDH-C₄- Aktivität auf eine hohe Dichte unbeweglicher Spermien schließen. Noch engere Korrelationen ergaben sich, im Widerspruch zur Literatur (29), bei der Berechnung der Verhältnisse des prozentualen Anteils der Aktivität des spermienpezifischen Isoenzym an der zugehörigen Gesamtenzymaktivität zu der Dichte der unbeweglichen Spermien. Die LDH- Ergebnisse waren mit $r = 0,89$ deutlich höher als die der PGK ($r = 0,74$). Trotzdem trägt der Parameter "% LDH-C₄ an der Gesamt LDH" nicht wesentlich zur Beurteilung eines Ejakulates bei, da auch der Vergleich mit anderen Spermindichtegruppen hohe Korrelationskoeffizienten zwischen $r = 0,74$ bei den lebhaft beweglichen Spermien und $r = 0,91$ bei der für den Andrologen weniger bedeutsamen Gesamt-spermindichte ergab.

6. LITERATUR

- 1) Bishop D.W. (1977) Symposium: Biochemistry of spermatogenesis. Federation proceedings vol. 37 no. 11 1978 sept.
- 2) Blake E.T., Sensabaugh G.E. (1975) Sperm diaphorase: Genetic polymorphism of a sperm-specific enzyme in man. Science vol 191: 1185-1186
- 3) Brooks D.E. (1978) Activity and androgenetic control of enzymes associated with the tricarboxylic acid cycle, lipid oxydation and mitochondrial shuttles in the epidymidis and epididymal spermatozoa of the rat. Biochem. J. 174: 741-752
- 4) Browder L.W. (1980) Developmental biology. Saunders College
- 5) Bruns C., Kurnit D., Gerhard D.S., Housman D. (1984) cDNA clones on chromosomes 11p and 12p identified with LDLI oligonucleotides. Cytogenetics and Cellgenetics 37:428
- 6) Bücher Th. (1947) Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment Biochim. Biophys. Acta 1:292-314
- 7) Bücher Th. Bender W., Fundele R., Hofner H., Linke I. (1980) Quantitative evaluation of electrophoretic allo- and isocyme patterns. FEBS letters 115 (2):319-324
- 8) Burgos C., Gerez de Burgos N.M., Coronel C.E., Blanco A. (1979) Substratespecifity of the lactate-dehydrogenase isoenzyme C₄ from human spermatozoa and a possible selective assay. J. Reprod. Fertil 55:101
- 9) Burgos Gerez de, N.M., Burgos C., Coronel C.E., Bertarelli de Camusso, Pignini T., Blanco A. (1979) Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme C₄ activity with the count and motility of human spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 55:107-111
- 10) Caldwell K., Blake E.T., Sensabaugh G.F. (1976) Sperm diaphorase: genetic polymorphism of a spermspecific enzyme in man. Science 191:1185

- 11) Chen S-H., Malcolm L.A., Yoshida A., Giblett E.R. (1971) Phosphoglycerate kinase : an x - linked polymorphism in man. *Am. J. Hum. Genet.* 23:87-91
- 12) Chen S-H., Giblett E.R. (1972) Phosphoglycerate kinase: additional variant and their geographic distribution. *Am. J. Hum. Genet* 36:61-67
- 13) Chen S-H., Donahue R.P., Scott C.R. (1976) Characterisation of phosphoglycerate kinase from human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 27:699
- 14) Dott H.M., Dingle J.T. (1968) Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmatic droplets of bull and ram. *Exp. Cell. Res.* 52:523-540
- 15) Eicher E.M., Cherry M., Flaherty L. (1978) Autosomal phosphoglycerate kinase linked to mouse major histocompatibility complex. *Mol. Gen. Genet.* 158:225
- 16) Ericson R.P., Fried D.S., Tennenbaum D. (1975) Localisation of lactate dehydrogenase X on the surface of mouse spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 91:1
- 17) Everitt B. (1974) Cluster analysis. Heinemann Educational Books
- 18) Goldberg E. (1963) Lactic and malic dehydrogenases in human spermatozoa. *Science* 139:602
- 19) Goldberg E. (1977) Isocymes in testes and spermatozoa. *Current Topics in Biological and Medical Research* 1:79
- 20) Gomes W.R., Van Demark N.L. (1974) The male reproductive system. *Annu. Rev. Physiol.* 36:307
- 21) Harrison R.A.P. (1971) Glycolytic enzymes in mammalian spermatozoa. Activities and stabilities of hexokinase and phosphofructokinase in various fractions from sperm homogenates. *Biochem. J.* 124:741
- 22) Harris H., Hopkinson D.A. (1978) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland publishing company

- 23) Harris H. (1980) The principles of human biochemical genetics. Elsevier / North-Holland Biochemical Press
- 24) Krietsch W.K.G., Bücher Th. (1970) 3-Phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle and yeast. Eur. J. Biochem. 17:568-580
- 25) Krietsch W.K.G., Krietsch H., Kaiser W., Dünwald M., Kuntz G.W.K., Duhm J., Bücher Th. (1977) Hereditary deficiency of phosphoglycerate kinase: a new variant in erythrocytes and leucocytes, not associated with haemolytic anaemia. European Journal of Clinical Investigation 7:427
- 26) Krietsch W.K.G., Freier I.U., Eber S.W. (1979) Multiple forms of human phosphoglycerate kinase. Arch. Biochem. Biophys. 193/2:415-421
- 27) Krietsch W.K.G., Eber S.W., Haas B., Ruppelt W., Kuntz G.W.K. (1980) Characterization of a phosphoglycerate kinase deficiency variants not associated with haemolytic anaemia. Am. J. Hum. Genet. 32:364-373
- 28) Hoppe - Seyler F., Thierfelder H. (1966) Handbuch der physiologisch- und pathologisch - chemischen Analyse. 10. Aufl. Springer Verlag
- 29) Mann T., Lutwak-Mann C. (1981) Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag
- 30) Markert C.L. (1975) Isocymes, vol 1-4. Academic Press
- 31) Meizel S., Boggs D., Cotham J. (1971) Electrophoretic studies of esterases of bull spermatozoa, cytoplasmatic droplets and seminal plasma. J. Histochem. a. Cytochem. 19/4:226-231
- 32) Salisbury G.W., Hart R.G., Lodge J.R. (1977) The spermatocon. Persp. Biol.Med. 20:372-393
- 33) Schmechta H. (1977) Zum Nachweis der Isoenzyme der Kreatinphosphokinase (CPK) nach Elektrophorese auf Zelloseacetatfolien. Z. med. Labor.-Diagn. 18:180

- 34) Schmechta H., Engel S., Kopetz B., Porstmann T. (1979) Bestimmung der Aktivität des Laktatdehydrogenaseisoenzyms X (LDH-X) im menschlichen Spermaplasma. *Dermat. Monatsschr.* 165:401
- 35) Schmechta H., Engel S. (1980) Kreatinphosphokinase (CPK) Aktivität und CPK-Isoenzymverteilung im menschlichen Sperma. *Dermat. Monatsschr.* 166:312
- 36) Schwerd W., Fehrer H.D. (1979) Über den Nachweis von erblichen Enzymeigenschaften in Sperma. *Z. Rechtsmed.* 83:129-138
- 37) Sidhu K.S., Guraya S.S. (1979) Glycolytic, Krebs cycle and pentosephosphate cycle enzymes in spermatocoe of the buffalo. *J. Reprod. Fert.* 57:205
- 38) Singer - Sam I., Simmer R.L., Keith D.H., Shirely L., Teplitz M., Itakura K., Gartler S.M., Riggs A.D. (1983) Isolation of cDNA clone for human X - linked 3-phosphoglycerate kinase by use of a mixture of synthetic oligodeoxyribonucleotides as detectionprobe. *Proc. natn. Acad. Sci.* 80:802-806
- 39) Skrabel H., Mettler L. (1977) Lactate dehydrogenase-X separation of human spermatozoa isozymes by extraction with detergents. *Res. exp. Med.* 171:297-299
- 40) Stewart A., Scopes R.K. (1978) Phosphoglycerate kinase B from ram testis. Purification, characterisation and comparison with the muscle isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 85:89
- 41) Valentine W.N., Hsieh H.S., Paglia D.E. et al. (1969) Hereditary hemolytic anemia associated with phosphoglycerate kinase deficiency in erythrocytes and leucocytes: a possibly X - linked syndrome. *N. Engl. J. Med.* 280:528-534
- 42) VandeBerg J.L., Cooper D.W., Close P.J. (1973) Mammalian testis phosphoglycerate kinase. *Nature New Biology* 243:48-50
- 43) VandeBerg J.L., Klein J. (1978) Localisation of mouse PGK-2 at the D - end of the H-2 complex. *J. Exp. Zool.* 203:319-324

- 44) Wheat T.E., Goldberg E. (1978) An allelic variant of the spermspecific lactate dehydrogenase C₄ (LDH-X) isozyme in humans. J. Exp. Zool. 202(3):425
- 45) Yoshida A., Watanabe S., Chen S-H., Giblett E.R., Malcolm L.A. (19) Human phosphoglycerate kinase. Structure of a variant enzyme. J. Biol. Chem. 247:446-449
- 46) Zaneveld L.J.D., Chatterton R.T. (1982) Biochemistry of mammalian reproduction. John Wiley & Sons

Zusammenfassung

Die somatischen und spermien-spezifischen Isoenzyme der Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) und der Phosphoglyceratkinase (PGK, EC 2.7.2.3) wurden in Homogenaten gewaschener human Spermien und Seminalplasma photometrisch und elektrophoretisch untersucht. Für die Stoffwechselenzyme HK (EC 2.7.1.1), CK (EC 2.7.3.2) und GPI (EC 5.3.1.9) wurden die Elektrophoresemethoden verbessert.

Mit Hilfe einer Variante der spermien-spezifischen Isoenzyme der LDH und PGK hätte deren chromosomale Lokalisation gefunden werden können. In 278 untersuchten Proben wurde keine Variante hinsichtlich elektrophoretischer Kriterien entdeckt, so kann ein Polymorphismus der LDH und PGK beim Menschen hier ausgeschlossen werden.

Mit umfangreichen Waschprozeduren konnte gezeigt werden, daß in Spermienhomogenaten nicht nur die spermien-spezifischen Isoenzyme LDH-C₄ und PGK-2, sondern auch die somatischen Isoenzyme der LDH und die PGK-1 (6-48%) exprimiert werden oder in sogenannten Cytoplasmatröpfchen unter der Membran am Spermienmittelstück vorkommen. Die Identifizierung der Spermien PGK-1 als identisch mit der somatischen PGK-1 gelang elektrophoretisch und mit in Hühnern induzierten anti PGK-1- Antikörpern im Vergleich mit Herzmuskelhomogenat.

Von 29 randomisierten Probanden wurden die Enzymaktivitäten der LDH- und PGK- Isoenzyme im Seminalplasma und aus ihnen berechnete Werte in Beziehung gesetzt mit den Dichtewerten der Motilitätsfraktionen. Die Berechnungen wurden nach der Methode der kanonischen Korrelation am Leibnitz Rechenzentrum München durchgeführt. Zum ersten Mal wurden bei einer Multivarianzanalyse mit dieser Thematik nicht nur Beziehungen der Gruppen der morphologischen zu den biochemischen Parametern hergestellt, sondern auch zwischen den Gruppenmitgliedern untereinander; erstmals wurden die PGK- Isoenzyme in solche Berechnungen mit einbezogen.

Für die Beurteilung der Güte eines Ejakulates, als morphologisches Kriterium sei die Dichte der lebhaft beweglichen Spermien genommen, eignen sich die Werte der Enzymaktivitäten und der daraus berechneten Parameter allein nicht; sehr wohl darf man von einer hohen LDH-C₄- Aktivität auf eine hohe Dichte unbeweglicher Spermien schließen.

LEBENS LAUF

Name	Ulrich Vogel
Geburtstag	02.08.1954
Geburtsort	Seefeld / Obb.
Eltern	Dr. Hans Joachim Vogel, prakt. Tierarzt Marianne Vogel, geb. Gambihler
Geschwister	1 Schwester
Familienstand	ledig
Konfession	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbesuch	1960-1964 Volksschule Inning/Ammersee -1968 hum.Gymnasium und Internat Ettal -1974 neuspr. Gymnasium Landsberg/Lech
Schulabschluß	allgemeine Hochschulreife
Studium	WS 1974/75 bis WS '75/76 Physik (TU München) ab SS 1979 Medizin an der LMU-München Approbation als Arzt November 1984
Pflegehelferkurs und Arbeit als Pflegehelfer in d. Inneren Klinik Herrsching	Dr. med. Robert Schindlbeck von Herbst 1976 bis Frühjahr 1979
Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung Kreiskrankenhaus Zwiesel	Leitung Dr. med. G. v. Haehling seit 01.01.1985
Arbeit an der Dissertation seit 1981 (Unterbrechungen durch Examina, praktisches Jahr und Arbeit)	

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

11111111

